取扱説明書

Freezing Medium for human ES/iPS Cells

Cat.# RCHEFM001

保存方法

本品は冷凍状態で発送されます。到着後すみやかに-80℃で保存して下さい。使用前に解凍し、解凍後は 2～8℃で保存して下さい。解凍後は 2 週間を目安に使い切って下さい。なるべく凍結融解は繰り返さないで下さい。

特長

- 高い生存率での凍結保存が可能になります
- 解凍後、通常 3～5 日後には継代が可能です。
- 凍結細胞は、-135℃以下のフリーザーで長期保存が可能です。
- 細胞は液体窒素で急速凍結させるため、プログラムフリーザーが不要です。
- ヒト iPS 細胞(Takahashi, K., et al., *Cell*, 131, 861-72, 2007)でロット試験済みです。
- pH、滅菌、マイコプラズマ検査済みです。
- Ready-to-use です。
- 血清は不含です。
  DMSO、Propylene glycol、2-Mercaptoethanol を含みます。

製品について

本品は研究用ですので、治療・診断目的には使用しないで下さい。また、本品を当社からの許可なしに第三者への販売や商業目的に使用することを禁じます。

使用方法

Freezing Medium for human ES/iPS Cells をご使用されるにあたり、以下の使用方法を十分にお読み下さい。フィーダーレス培養(ReproFF を使用)中のヒトES/iPS細胞にも同様のプロトコルでご使用いただけます。ただし生存率が落ちる場合もございますのでご注意下さい。

A. 凍結方法

凍結を始める前に

高い生存率を得るためには、細胞を本製品に懸濁後、液体窒素により急速凍結させることが重要です。懸濁から凍結までに時間がかかると細胞生存率が極端に低下する原因になります。操作をスムーズに進めるために、完全に準備が整っていることを確認してから凍結操作を開始して下さい。貴重なサンプルを凍結解凍される際は、操作に十分慣れてから行われることをおすすめします。

必要なもの

(以下の試薬用量は、オンフィーダー培養 60mm ディッシュ 1 枚の場合です。)

・本品:Freezing Medium for human ES/iPS Cells を使用前に解凍し、氷中で冷やしておきます。(以下、これを「保存液」と総称する)
・Primate ES Cell Medium に 5ng/mL bFGF(RCHEOT002, 003)を添加したもの(以下、これらを「ES Medium」と総称する)を使用前に室温に戻しておきます。(または、ReproFF+5ng/mL bFGF)
・Dissociation Solution for human ES/iPS Cells(以下、これを「剥離液」と総称する)を使用前に室温に戻しておきます。
・コンフルエント状態のヒト ES/iPS 細胞
35 mm から 100 mm ディッシュサイズの場合、各 1 枚から凍結チューブ各 1 本へ凍結可能です。
・PBS (-):Ca^{++},Mg^{++}-free PBS
・15 ml 遠心チューブ
・液体窒素
・氷
・ピンセット (液体窒素につけても大丈夫なものをご用意下さい。)
・p-1000 ピペットマンおよび滅菌済みチップ
・1 ml 凍結チューブ
・凍結チューブたて
・その他培養操作に通常必要なもの

操作方法

A1、必要なものを準備します。
・凍結チューブに必要事項(細胞名、継代数、日付、ディッシュサイズ等)を記入し、氷上で冷やしておきます。
・液体窒素をクリーンベンチの中に置きます。**細胞を保存液に懸濁後、液体窒素中で凍結が完了するまでの時間が細胞生存率へ大きく影響します。そのため、細胞を液体窒素中につけるまでの時間を短くする(15 秒以内)ことが重要です。**
・クリーンベンチ内の準備をします。15ml 遠心チューブ、凍結チューブたて、ピンセット、p-1000 ピペットマンおよび滅菌済みチップを使いやすい所に配置します。P-1000 ピペットマンをあらかじめ 200μL にセットしておきます。
A2、コンフルエント状態のヒト ES/iPS 細胞を準備します。
A3、ES Medium を除き、PBS(-) 2～3 mL で細胞を洗います。
A4、剥離液をディッシュに 1 mL 加え、細胞表面全体に液が行き渡るようにした後、37℃、CO_2 インキュベーターで 5 分程加温します。
A5、ES Medium を 2～3 ml 加え、コロニーを塊のまま剥がし、15 mL 遠心チューブに移します。凍結解凍の作業過程でコロニーは自然にほぐれるため、ここでコロニーをくずす必要はありません。
A6、約 170×g(1,000 rpm)、4℃、5 分間遠心し、上清をできるだけ取り除きます。
A7、サンプルが数本ある場合は、上清を取り除いた後、氷冷しておきます。注 1)

以下の操作は、1 サンプルずつ行うようにして下さい。
A8、あらかじめ氷冷しておいた凍結チューブ 1 本をクリーンベンチ内に用意します。
A9、p-1000 ピペットマンで保存液を 200μL はかりとります。**注2)**
A10、保存液を操作 A7 で得られたチューブに加え、細胞を懸濁後、凍結チューブへすばやく移し、すぐに蓋を閉めてピンセットで凍結チューブを保持し、チューブの底部から 2/3 までを液体窒素にひたします。**注3)**
(この操作を手早く行う事が非常に重要です。操作 A10 は 15 秒以内を目安に作業を完了させて下さい。)
A11、液体窒素中で十分に冷却し、その後、液体窒素タンクもしくは-135℃以下のフリーザーに移します。

B. 解凍方法

解凍を始める前に

あらかじめ十分にあたためた ES Medium を凍結細胞に加えることで急速解凍を行います。この操作に時間がかかると生存率低下の原因になります。解凍操作は凍結チューブ 1 本ずつ行うようにして下さい。**ウォーターバスでの解凍は細胞生存率を極端に低下させる原因になりますので、絶対に行わないで下さい。**

必要なもの

・本製品で凍結されたヒト ES/iPS 細胞
・ES Medium(または、ReproFF+5ng/mL bFGF)
・15 ml 遠心チューブ 1 本
・フィーダー細胞を播種したディッシュ(ディッシュのサイズは、凍結時のディッシュサイズと同じものをご用意下さい。)
・ドライアイス(または液体窒素)
・その他培養操作に通常必要なもの

操作方法

B1、あらかじめ 15 mL 遠心チューブに ES Medium を 10 mL 加え 37℃ウォーターバスで温めておきます。
B2、凍結細胞を液体窒素もしくはフリーザーから取り出し、液体窒素(またはドライアイス)で保存しながらクリーンベンチまで運びます。ドライアイスで運ぶ場合は、凍結細胞をドライアイスに埋めた状態で運んで下さい。
B3、操作 B1 で準備したチューブをクリーンベンチ内に準備します。
B4、液体窒素から凍結細胞を取り出し、**すぐに 37℃に温めた ES Medium を 800μL 加え、2～3 回ピペッティングを行うことで急速解凍します。(この操作をすばやく行うことが非常に重要です。)**
B5、細胞懸濁液を B1 で準備した 15 mL チューブに移します。
B6、約 170×g(1,000 rpm)、4℃、5 分間遠心します。
B7、上清を除き、新しい ES Medium を 4 mL を加え懸濁します。(コロニーを小さくしないように懸濁します。)
B8、フィーダー細胞を播種したディッシュからフィーダー細胞用の培地を取り除き、操作 B7 の細胞懸濁液を加え、37℃ CO_2 インキュベーターで培養を開始します。翌々日から毎日 ES Medium を交換して下さい。通常 3～5 日後には継代可能な状態になります。

ご注意)

1)上清が残っていると保存液が希釈されるため、凍結解凍後の細胞生存率低下の原因になることがあります。
2)凍結する細胞数にかかわらず、保存液は凍結チューブ 1 本あたり 200μL で凍結可能です。
3)細胞を保存液に懸濁する際は、2～3 回のピペッティングで充分です。それ以上の操作は生存率低下の原因になります。

関連製品

RCHEMD001	Rrimate ES Cell Meddium
RCHEMD003, 004	ReproFF
RCHEMD005	Repro Stem
RCHETP002	Dissociation Solution for human ES/iPS Cells
RCHEOT001	ReproCoat
RCHEOT002, 003	bFGF
RCHEOT004	Lamimin-5
RCHEFC001	Feeder Cells (SL10)
RCHEFC003	Feeder Cells (MEF)

株式会社リプロセル
http://www.reprocell.com
E-mail: info_jp@reprocell.com